

수성이상계에서 Pluronic F-68과 산소전달물질이 참당귀 현탁세포 증식에 미치는 영향

전 수 환 · 이 경 훈 · 권 준 영 · 류 현 남 · † 김 동 일
인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 2006. 12. 29., 게재승인 : 2007. 8. 6.)

Effects of Pluronic F-68 and Oxygen Vectors on the Cell Growth of *Angelica gigas* Nakai in Aqueous Two-Phase System

Su-Hwan Cheon, Kyoung-Hoon Lee, Jun-Young Kwon, Hyun-Nam Ryu, and Dong-Il Kim†
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2006. 12. 29., Accepted : 2007. 8. 6.)

Pluronic F-68 and oxygen vectors were applied to increase the cell growth of *Angelica gigas* Nakai in aqueous two-phase system (ATPS). ATPS was composed of 3.6% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 20,000 and 2.8% (w/v) crude dextran. *n*-Hexadecane, *n*-dodecane and FC-40 were used as oxygen vectors to enhance the oxygen transfer in ATPS. With 2~10 g/L of Pluronic F-68, addition of *n*-hexadecane and FC-40 significantly enhanced the oxygen transfer rate as well as the maximum cell mass in a medium with ATPS. However, *n*-dodecane reduced the cell growth in all treatments. Maximum cell densities were increased up to 27.5% with 10 g/L of Pluronic F-68 and up to 40.2% with 8% (v/v) *n*-hexadecane compared to those of the controls without Pluronic F-68 and oxygen vectors. It was confirmed that the cell growth could be increased in ATPS using *n*-hexadecane.

Key Words : Pluronic F-68, oxygen vectors, aqueous two-phase system, *Angelica gigas*

서 론

당귀는 미나리과에 속한 다년생 초목으로 참당귀 (*Angelica gigas* Nakai, 토당귀)와 일당귀 (*Angelica gigas* Kitagawa)로 구분한다. 참당귀는 우리나라와 중국의 동북부 지역에 자생 분포하며, 주 재배지역은 고랭지인 봉화, 평창, 삼척 등이다. 참당귀의 주요 성분으로서 coumarin계 물질인 decursin, decursinol angelate, nodakenin, umbelliferon, α -pinene, limonene, b-sitosterol, elemol 등이 알려져 있다(1). 최근, 참당귀의 뿌리로부터 분리한 다당류가 T-lymphocyte 관련 면역활성에 영향을 미친다는 결과가 보고된 바 있다(2). 특히 decursin과 decursinol angelate는 구조적으로 유사할 뿐 아니라 암세포에 대한 효과도 비슷하며, 폐암, 간암, 자궁암, 대장암 등 다양한 암세포주에 대해 강한 치사작용을 나타낸다(3).

식물세포배양은 이차대사산물과 재조합 단백질을 효율

적으로 생산하기 위한 시스템으로 그 중요성이 점차 부각되고 있다(4). 식물세포는 식물체에 비해 증식속도가 빠르며 지리적, 기후적 제약을 받지 않고, 인위적 환경조절이 가능하여 최적의 조건에서 유용성분을 생산할 수 있다(5). 이와 같은 식물세포배양에 의한 유용물질 생산에 관한 연구 분야는 생산성 증진 측면에서 elicitor의 사용, 배지최적화, 전구물질 첨가, 성장조절제의 선택, 배양 조건 최적화 등을 들 수 있다. 한편 배양과 동시에 목적 물질을 분리, 정제할 수 있는 복합생물공정을 이용하고자 하는 시도들이 이루어지고 있으나 식물세포배양에서 이와 같은 연구 결과는 아직 많지 않은 실정이다(6).

수성이상계 (aqueous two-phase system)는 두 가지 고분자 수용액을 혼합하여 형성된다. 고분자 물질로는 polyethylene glycol (PEG)과 dextran이 흔히 사용되며 염으로 인산염이나 황산염이 주로 쓰인다(7). 세포와 목적산물이 각기 다른 상으로 분배되는 경우 수성이상계를 이용하면 배양과 동시에 목적산물을 분리할 수 있으며 *in situ* 회수가 가능해져 즉각적인 생성물 회수와 세포의 활성을 유지시켜 장기간 동안의 배양이 가능하다(8). 수성이상계는 수분함량이 높고, 생물학적 친화성이 우수하므로 직접 세포배양이 가

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7515, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : kimdi@inha.ac.kr

능하다. 따라서 배양과 동시에 목표 물질을 추출하는 복합 생물공정도 적용할 수 있다. 그러나 식물세포배양에서 수성이상계의 형성은 세포에 독성을 미치지 않는다 하더라도 일반 배지보다 점도가 높아 물질전달과 산소전달이 감소되어 세포증식에 부정적인 영향을 미친다(8). 교반 속도와 통기량을 높여 산소와 물질전달을 증가시켜도 세포 증식 증진에 한계가 있다(9). 최근 수성이상계에서 담배세포로부터 치료용 단백질을 분리하고자 하는 연구도 시도되고 있다(10).

Pluronic F-68은 비이온성 계면활성제로서 삼중합체 고분자 (triblock copolymer) 구조를 갖는다(11). Fig. 1에 나타낸 것과 같이 내부에 소수성 부분이 20%인 polyoxypropylene block과 양측에 친수성 부분이 80%인 polyoxyethylene blocks로 구성되어 있으며, 평균분자량이 8,350이다. Pluronic F-68이 세포에 미칠 수 있는 영향은 크게 다음과 같은 다섯 가지로 요약할 수 있는데, 세포내로 물질전달을 증대시켜 세포생장을 촉진하며(12), 세포표면을 둘러싸아 전단력 (shear)으로부터 받는 영향을 줄일 수 있고(13), 동결보존시 해동 후 회복배지에 첨가하여 세포의 증식을 향상시키며(14), 세포표면의 막 관통 미세공을 형성하여 투과성을 증대시킬 수 있고(15), 산소전달물질의 emulsion을 안정화시키는 물리·화학적 변화를 야기하는 성질을 들 수 있다(16).

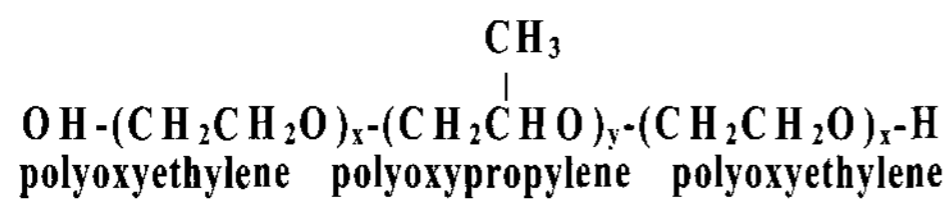


Figure 1. The structure of Pluronic F-68.

산소전달물질 (oxygen vector)에는 탄화수소계의 *n*-hexadecane, *n*-dodecane 등이 있으며, 탄화수소의 수소 원자들이 불소로 치환된 perfluorochemical계인 FC-40이 있다(17). 산소전달물질의 산소용해도는 탄화수소계가 순수한 물보다 5~10배 이상이며, perfluorochemical계인 경우 20배 이상 높다. 또한 산소전달물질은 화학적으로 비활성적이고 높은 온도에서도 안정성을 가지며, 세포의 생장에 독성이 없고 세포에 의해 분해되지 않으면서 재사용이 가능하며 가격도 저렴하다(18). Ju(19)에 의한 연구에서는 산소의 전달을 증대시키기 위해 perfluorochemical을 유화 형태로 배지에 공급하여 비증식속도를 높인 결과도 보고되었다.

식물세포배양을 이용한 유용물질 생산에 있어서 생산동시 분리가 가능한 복합배양공정에 사용할 수 있는 수성이상계는 높은 점도로 인해 영양분과 산소의 전달이 저해되는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 수성이상계에 물질전달과 산소전달을 증가시키기 위해 Pluronic F-68과 산소전달물질을 적용하여, 당귀세포의 증식을 증진시키고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 배지

본 연구에서는 *Angelica gigas* 현탁세포를 SH (Schenk &

Hildebrandt) 액체 배지를 기본으로 하여 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 첨가하여 배양하였다. 세포배양을 위해서는 180 mL의 배지가 담긴 500-mL 삼각플라스크를 이용하여 25°C, 120 rpm에서 암조건을 유지하였고, 계대배양은 8일 간격으로 수행하였다.

세포량 측정

세포의 증식을 확인하기 위해서 세포생체량 (FCW, fresh cell weight)과 세포건조량 (DCW, dry cell weight)을 측정하였다. 100-mL Erlenmeyer flask에서 배양한 현탁 세포를 Buchner funnel을 이용하여 Whatman No. 1 여과지 상에서 시료의 배양액을 걸러내었다. 배지와 동량의 증류수로 2~3회 세척한 후, 진공펌프를 이용하여 수분을 제거하고 미리 무게를 측정한 측량접시에 세포를 옮겨 담아 화학저울로 FCW를 측정하였다. FCW를 측정한 후 60°C의 건조기에서 48시간 동안 항량이 될 때까지 건조시켜 DCW를 측정하였다.

수성이상계 준비 및 형성

Polyethylene glycol (PEG) 20,000과 분자량 5,000,000~40,000,000의 crude dextran을 이용하여 수성이상계를 형성하였다. 두 고분자 물질은 Sigma사로부터 구입하였다. 이들 고분자 물질은 각기 성장배지를 이용하여 수용액으로 제조하였으며 60°C의 항온조에서 용해시켰다. 수성이상계 제조시 점도가 높아 부피정량이 어려우므로 모든 조작은 질량을 기준으로 수행하였다. 수성이상계는 PEG와 crude dextran을 1 : 2.33의 중량비로 혼합하여 만들었다. 당귀세포의 경우, 2% (v/v)의 액체접종을 실시하였으며, 총 부피비가 30 mL이 되도록 24 g의 수성이상계를 준비하였다. 수성이상계의 상분리는 온도의 영향을 받으므로 모든 실험을 25°C에서 실시하였다.

산소전달물질의 유화

본 연구에 이용된 산소전달물질은 *n*-hexadecane, *n*-dodecane, FC-40이었으며 유화시켜 사용하였다. 이를 위해 산소전달물질과 증류수의 부피비를 1 : 2로 하여 60 mL을 만든 후 여기에 6 g/L의 Pluronic F-68을 첨가하였다. Pluronic F-68은 산소전달물질의 유화를 오랫동안 유지시켜주는 안정제로서 이용하였다. 그 후 산소전달물질 용액을 15분 동안 초음파 처리하여 미세한 emulsion 용액을 만들었다.

산소전달계수 (k_La) 측정 방법

산소전달계수 (k_La)의 측정은 dynamic gassing-out 방법을 이용하였으며, YSI사의 Model 508 용존 산소 (DO, dissolved oxygen) 측정기를 이용하였다. 25°C 조건에서 측정을 실시하였는데 우선 질소를 주입시켜 DO 값을 0으로 만든 후 공기를 주입하면서 DO 값이 올라갈 때의 시간을 측정하여 아래와 같은 식에 대입시켜 산소전달계수를 측정하였다.

$$\ln(100 - C_L) = -k_La \cdot t$$

이때 C_L 은 배지 내 DO를 백분율로 나타낸 것이며, t 는 각

구간별로 DO 값이 상승할 때 측정된 시간을 의미한다.

결과 및 고찰

산소전달계수 (k_{La})의 변화

Pluronic F-68과 산소전달물질 농도별로 첨가하여, 배지 내의 산소전달계수 (k_{La})의 변화를 조사하였고 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

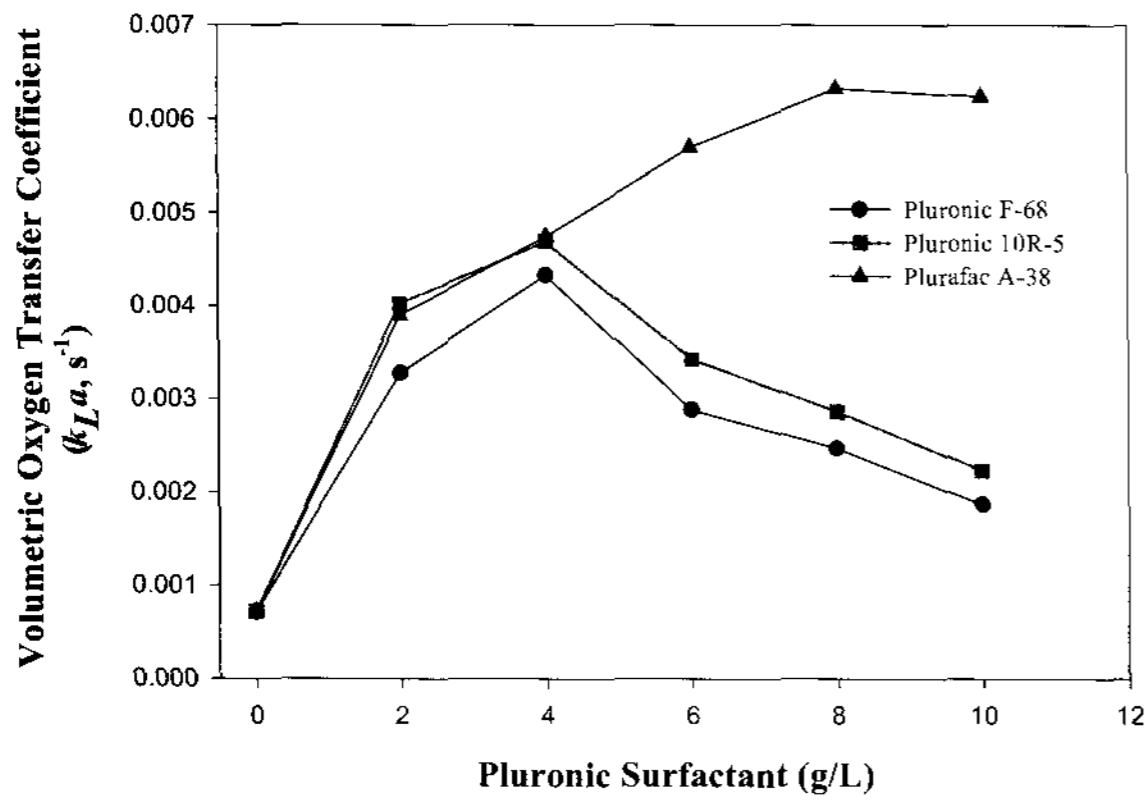


Figure 2. Effect of various Pluronic surfactants on k_{La} in SH medium.

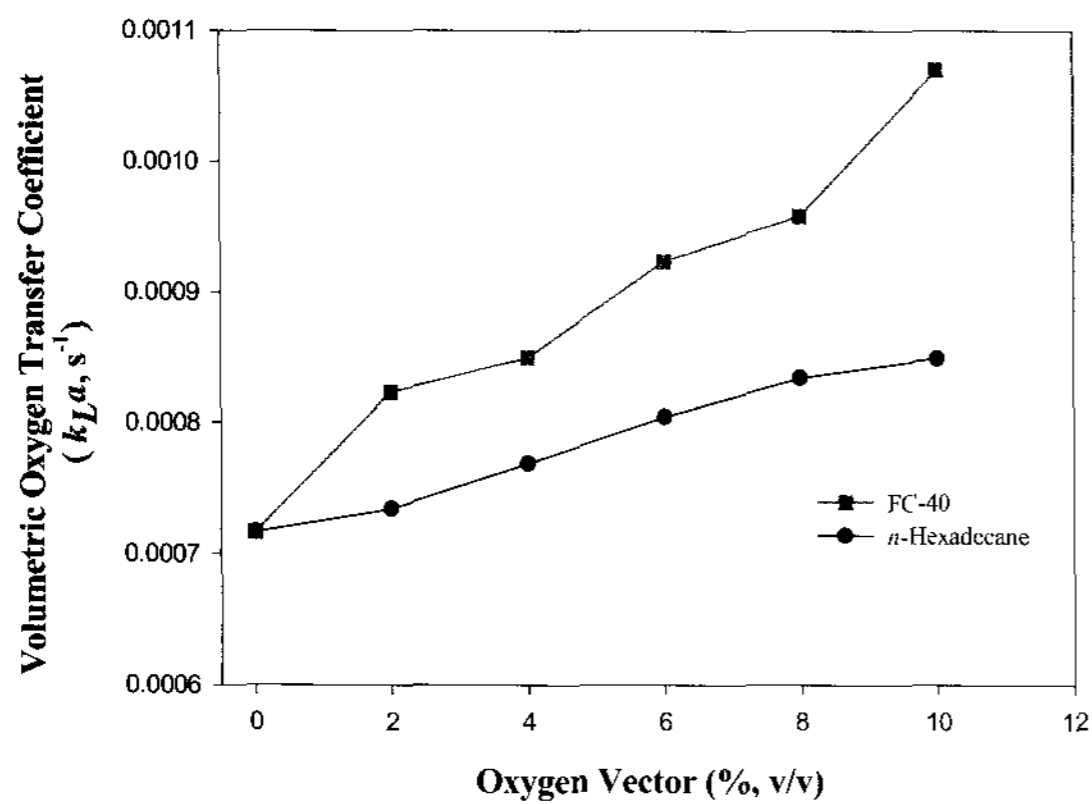


Figure 3. Influence of oxygen vector on k_{La} in SH medium.

Pluronic F-68과 Pluronic 10R-5인 경우, 4 g/L 이상의 농도에서 k_{La} 가 점차 감소되었고, Plurafac A-38이 k_{La} 를 가장 효과적으로 증대시킴을 관찰하였다. 계면활성제의 농도가 CMC (critical micelle concentration) 이상이 되면 배지의 점도를 증가시킬 뿐 아니라 오히려 k_{La} 를 감소시켜 산소 전달을 저해한다고 알려져 있다(20). 산소전달물질의 경우, *n*-hexadecane와 FC-40을 이용하였다(Fig. 3). 산소전달물질 농도별로 첨가하였을 경우, k_{La} 가 점차 증가함을 확인하였고, FC-40이 10% (v/v)로 첨가된 경우 k_{La} 는 $0.00107 s^{-1}$, *n*-hexadecane인 경우 $0.00084 s^{-1}$ 이었다. 산소전달물질 유화 용액으로 만들어 사용하게 되면 표면장력을 낮추고 기체

특이 계면 표면적을 증가시켜 기체-액체 계면에 변화를 주어 산소전달을 효과적으로 증대시킬 수 있다(21). 따라서, FC-40의 첨가가 *n*-hexadecane보다 k_{La} 를 효과적으로 증진시켰지만, Pluronic 계열의 계면활성제보다 10배 정도 낮음을 확인하였다.

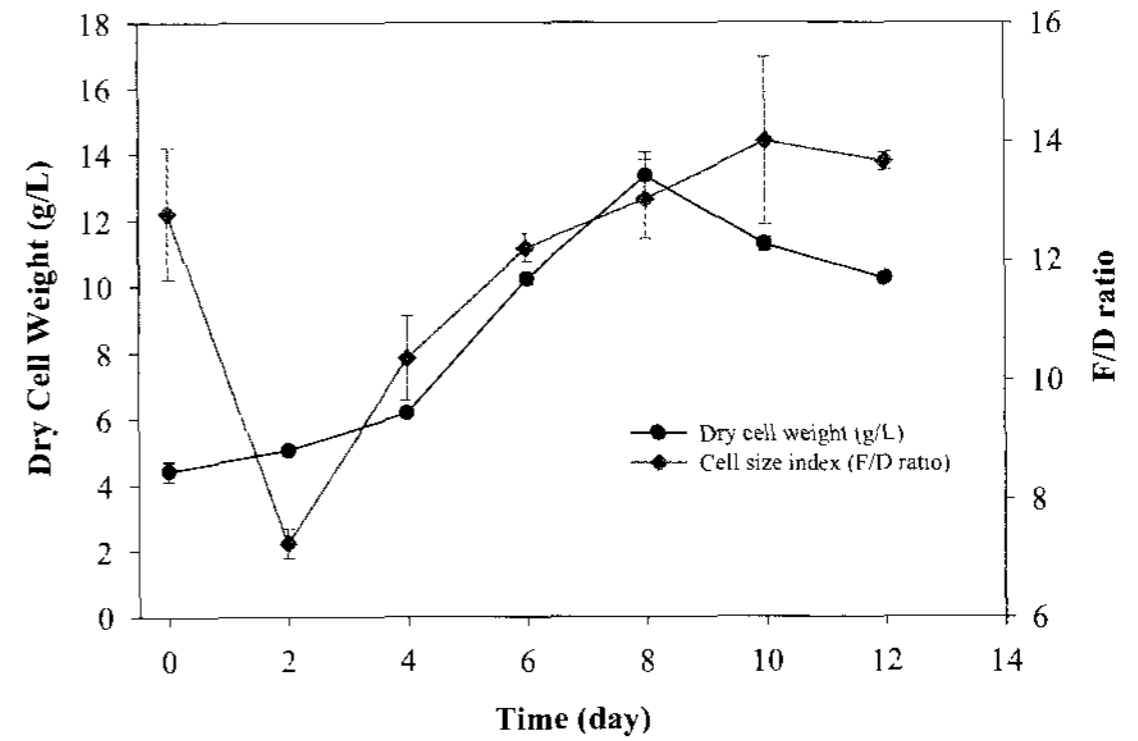


Figure 4. Time course changes of cell growth and cell size index in *A. gigas* Nakai suspension cultures. F/D ratio is a cell size index, which means FCW/DCW ratio.

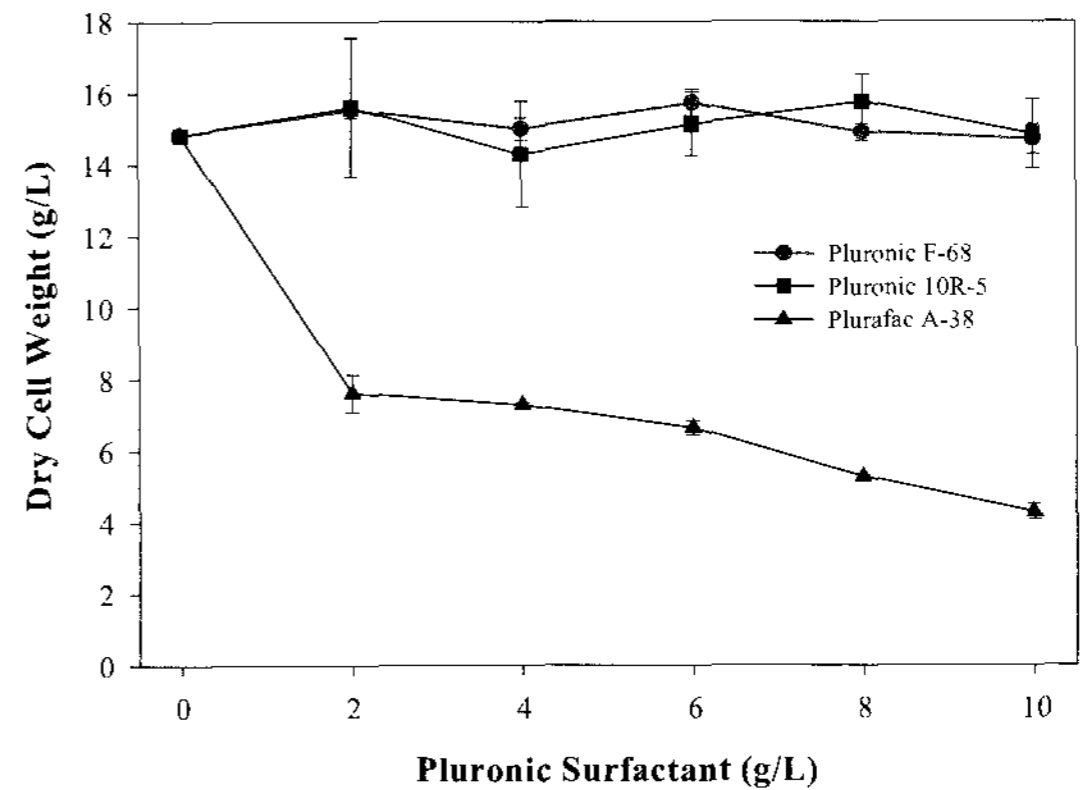


Figure 5. Effect of various Pluronic surfactants on the cell growth of *A. gigas* Nakai.

당귀세포의 현탁 배양 특성

당귀 현탁세포 배양에서 세포 증식과 세포크기지수를 관찰하였다(Fig. 4). 회분식 배양시, 지수증식은 4일째부터 시작되었으며, 최대 세포증식은 8일째 13.3 g DCW/L 였다. 8일째 이후에는 급속한 사멸기에 접어들었다. 당귀세포의 세포크기 지수는 최저 7 부근의 값을 가지므로, 세포크기 지수가 20인 담배세포보다 3배 정도 작음을 의미한다. 이는 당귀세포가 담배세포보다 높은 최종 세포농도까지 배양될 수 있음을 뜻한다. 특히 당귀세포는 배양중 다른 세포에 비해 세포외로 방출되는 다당류의 생산이 많아 배지의 점도가 다른 식물세포배양에서보다 높다.

Pluronic F-680이 세포증식에 미치는 영향

Pluronic 계열의 계면활성제가 세포증식에 미치는 영향을

조사하기 위하여 Pluronic F-68, Pluronic 10R-5, Plurafac A-38을 농도별로 첨가하였다(Fig. 5). Pluronic F-68의 경우 6 g/L까지 대조군보다 세포증식을 증진시키는 효과를 보였지만, 그 이상의 농도에서는 점차 감소하는 경향을 보였다. 계면활성제의 농도가 CMC 이상이 되면 배지의 점도를 감소시켜 세포증식에 부정적인 영향을 줄 수 있음이 보고된 바 있다(13). Pluronic 10R-5는 10 g/L의 농도까지 세포증식을 증진시키는 경향을 보였지만, Plurafac A-38인 경우, 2 g/L에서도 세포증식을 저해함을 확인하였다. Plurafac A-38은 다른 두 계면활성제와는 달리 이중합체 고분자 (diblock copolymer)이며 소수성 부분인 탄화수소 그룹을 지니고 있다. 계면활성제의 소수성부분은 세포표면의 소수성 부분과 상호 작용할 수 있는데, 이 소수성 부분의 차이에 의해 세포증식에 다른 영향을 미칠 수 있다. 소수성 부분의 분율이 서로 다른 Pluronic polyol을 사용하여 전단력에 대한 세포의 보호효과를 조사한 결과 소수성 부분의 분율이 클수록 세포의 파괴가 더 많아진다고 한다(22). 따라서 계면활성제의 구조와 소수성 부분의 차이가 세포증식에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었다.

는 당귀 세포가 회분식 배양에서 산소의 제한에 의해 세포증식이 크게 저해되지 않음을 나타낸다. 오히려, 산소전달물질이 첨가되어 세포내에 과량의 산소 자유기 (radical)를 생성하여 산소 스트레스에 의해 유해한 영향을 미쳤을 것으로 사료된다(23).

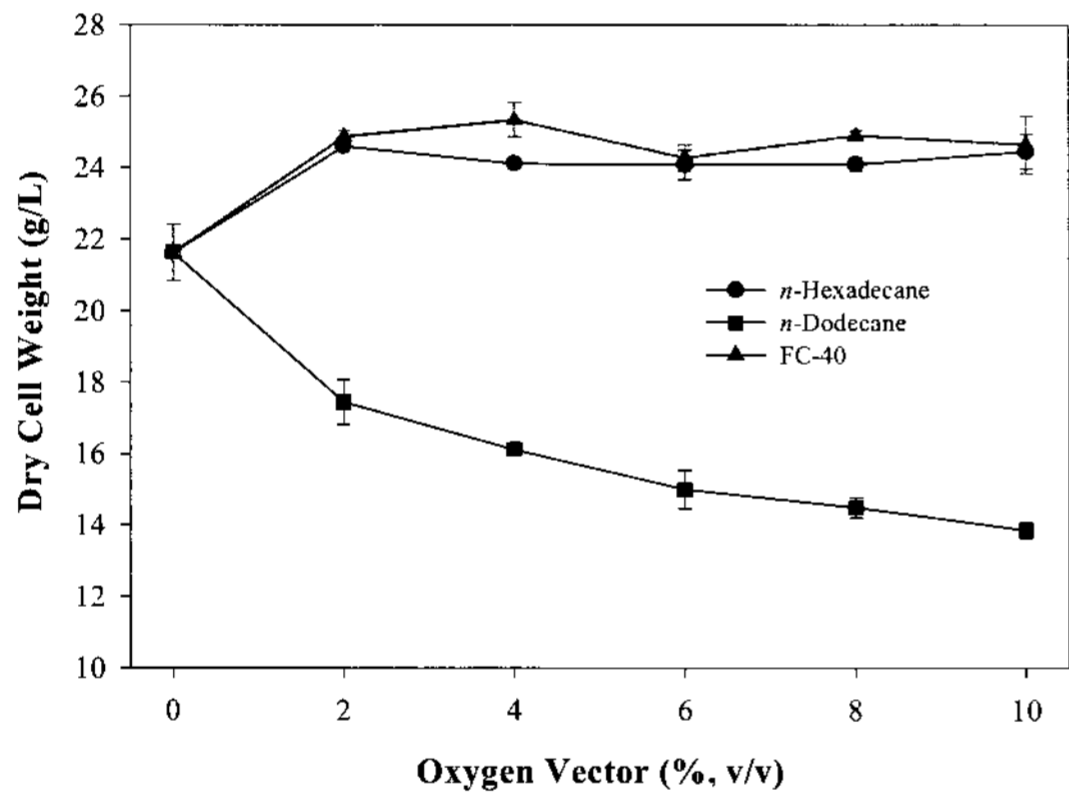


Figure 6. Effect of various oxygen vectors on the cell growth of *A. gigas* Nakai.

산소전달물질이 세포증식에 미치는 영향

여러 가지 산소전달물질이 당귀세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 6에 정리하였다. 다양한 농도의 n-hexadecane, n-dodecane, FC-40을 각각 최대 10% (v/v)까지 첨가하고, 12일째에 세포량을 비교하였다. n-Hexadecane과 FC-40은 10% (v/v) 농도까지 세포의 증식을 저해하지 않았다. FC-40은 4% (v/v)에서 대조군보다 세포증식을 17.1% 증진시킴을 관찰하였다. 그러나 n-dodecane의 경우는 2% (v/v)에서도 세포의 증식을 저해하였다. 회분식 배양에서 산소전달물질을 첨가하여 당귀세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 n-hexadecane과 FC-40을 2, 4% (v/v)로 첨가하여 배양을 수행하였다. n-Hexadecane의 2, 4% (v/v)의 초기 첨가는 대조군에 비해 지연기를 연장시켰으며, 또한 최대세포증식에 도달하는 시기를 2일 더 지연했음을 확인하였다(Fig. 7). FC-40의 경우 대조군에 비해 최대세포증식이 낮음을 관찰 할 수 있었다(Fig. 8). 이

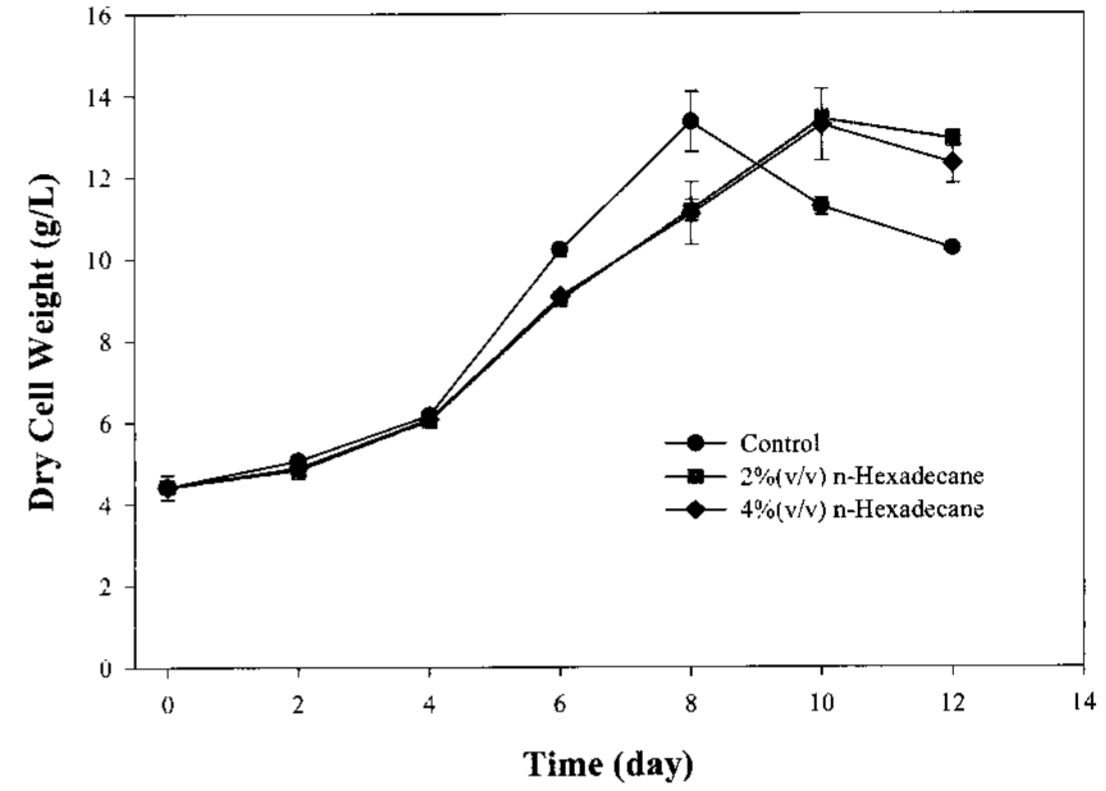


Figure 7. Cell growth of *A. gigas* Nakai with n-hexadecane.

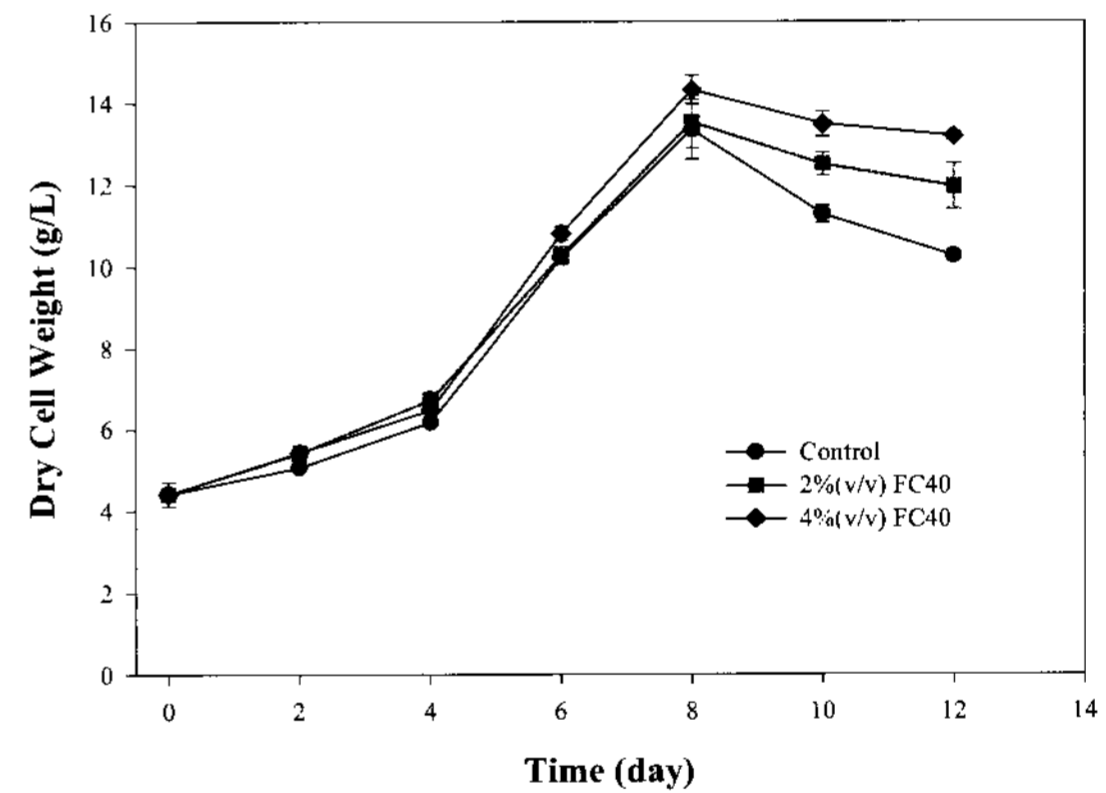


Figure 8. Cell growth of *A. gigas* Nakai with FC-40.

수성이상계에서 Pluronic F-68의 영향

수성이상계는 사전에 당귀세포 배양에 최적화된 조건을 이용하였다. 선별된 시스템은 세포농도가 가장 높은 12% (w/v)의 PEG 20,000과 4% (w/v)의 crude dextran을 혼합시켜 얻은 3.6% (w/v) PEG 20,000/2.8% (w/v) crude dextran 시스템이었다. 대조군 1, 2는 각각 SH 배지에서 Pluronic F-68이 첨가되지 않은 경우와 수성이상계에 Pluronic F-68이 첨가되지 않은 경우의 세포 증식을 나타낸다(Fig. 9). 대조군 2에서 당귀세포는 최적화된 수성이상계에서 배양이 가능하였으나, 대조군 1보다는 지연기가 연장되고 최대 세포증식이 이를 더 늦춰짐을 확인하였다. 이는 SH 배지보다 수성이상계가 높은 점도와 삼투압을 지니기 때문에, 물질전달과 산소전달이 저해되어 세포증식에 부정적인 영향을 주었을 것이라고 생각된다. Pluronic F-68을 10 g/L로 첨가한 경우 대조군 2보다 세포증식이 27.5% 증진됨을 관찰하였다. *Morinda citrifolia*로부터 이상계를 이용한 anthraquinone 생산

시, Pluronic F-68을 적용해 생산성을 향상시킨 결과가 보고된 바 있다(24).

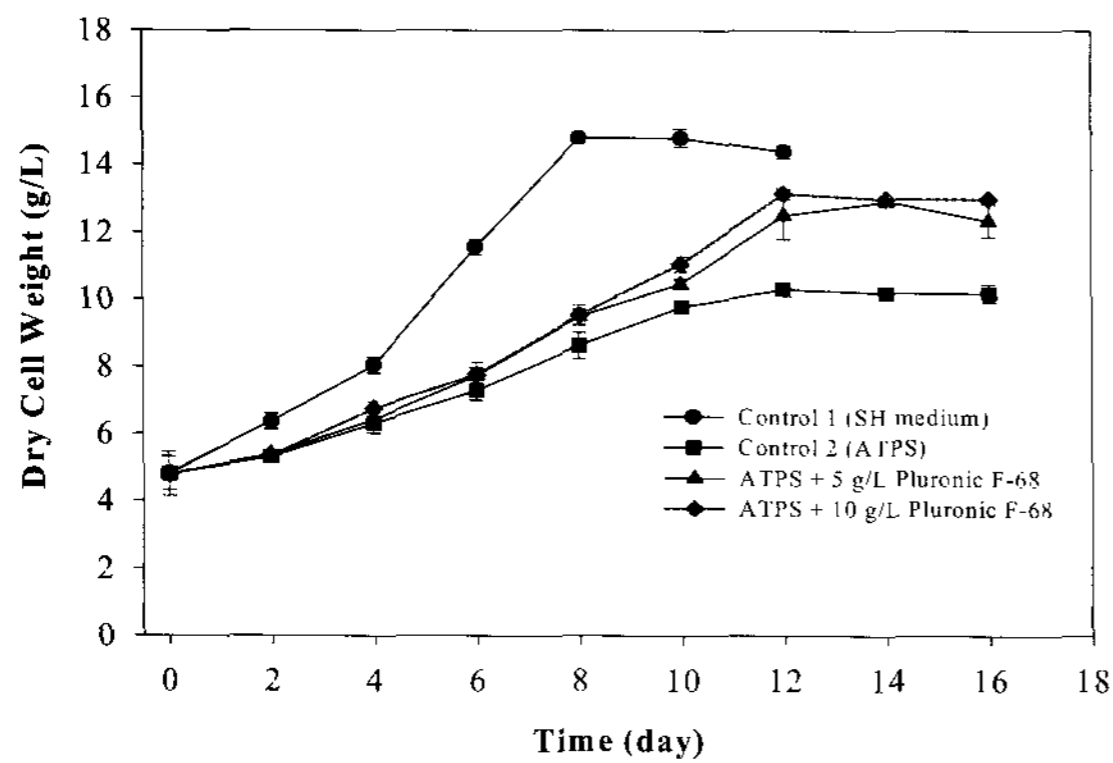


Figure 9. Time course profiles of the cell growth of *A. gigas* Nakai in aqueous two-phase system with Pluronic F-68.

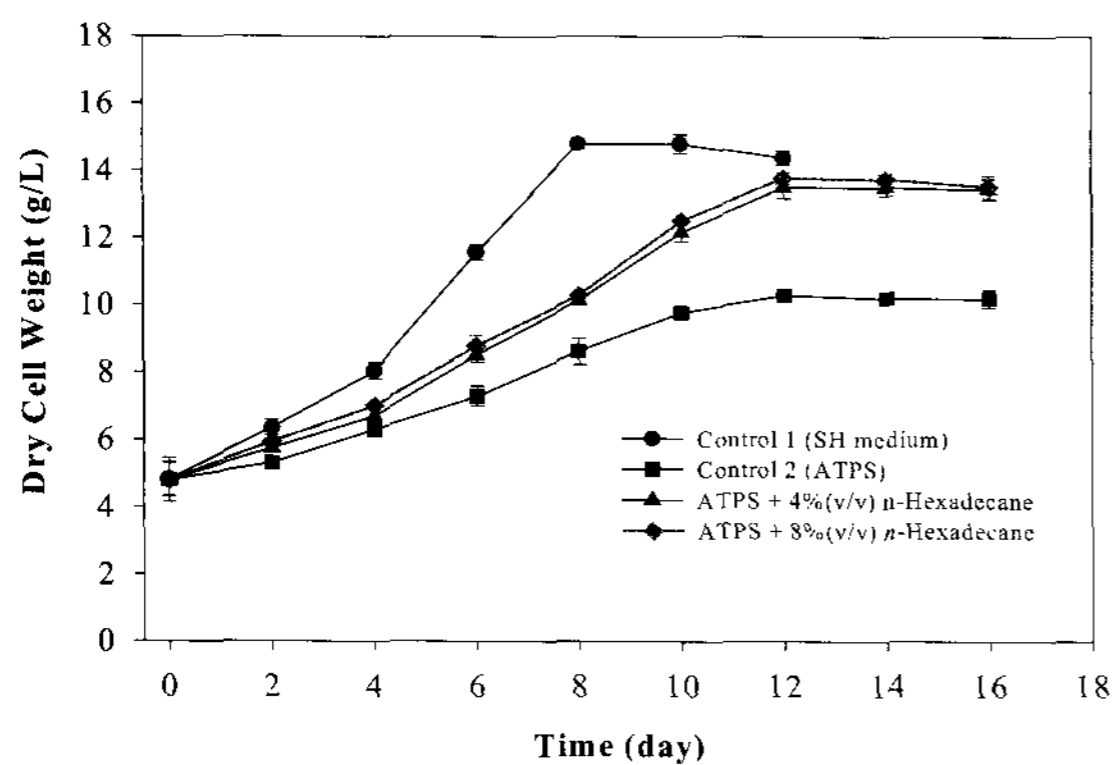


Figure 10. Time course profiles of the cell growth of *A. gigas* Nakai in aqueous two-phase system with *n*-hexadecane.

수성이상계에서 산소전달물질의 영향

FC-40이 *n*-hexadecane보다 10% (v/v) 이내의 농도범위에서 당귀세포의 증식을 1~2% 정도 증진시켰지만, 다른 산소전달물질에 비해 가격이 비싸기 때문에 대량생산을 위한 공정을 고려할 경우, 그 사용이 제한적이다. 따라서 FC-40에 비해 저렴한 *n*-hexadecane을 선택하였다. Fig. 10에서 볼 수 있는 것과 같이 수성이상계에서 *n*-hexadecane의 첨가는 대조군 2보다 세포증식을 향상시켰다. *n*-Hexadecane을 8%(v/v)로 첨가한 경우, 12일째에 대조군 2에 비해 세포증식을 40.2% 증대시켰다. *n*-Hexadecane을 1~6% (v/v)로 sorbose 발효에 적용하여 생산성을 향상시킨 결과가 알려져 있으며(25), bioreactor에서 탄화수소계의 산소전달물질을 이용하여 산소전달을 증진시킬 수 있음도 보고되었다(26). 따라서 식물세포배양에서도 *n*-hexadecane의 첨가는 세포증식에 긍정적이라고 할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 수성이상계에서 Pluronic F-68과 산소전달물질을 적용하여, 물질전달과 산소전달을 증가시켜 당귀세포의 증식을 향상시켰다. 특히 산소전달물질인 *n*-hexadecane이 Pluronic F-68보다 수성이상계에서의 당귀 세포증식에 더 긍정적임을 확인하였다. 따라서 Pluronic F-68과 적절한 산소전달물질의 첨가는 수성이상계 뿐만 아니라 대량배양을 위한 고농도배양 등에 효과적으로 적용가능하리라 사료된다.

감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터 및 BK21 생물공학융합 해양자원산업화사업단의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ham, M. S., S. S. Kim, J. S. Hong, J. H. Lee, E. K. Chung, Y. S. Park, and H. Y. Lee (1996), Screening and comparison of active substances of *Angelica gigas* Nakai produced in Kangwon and *Angelica acutiloba* Kitagawa produced in Japan, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 624-629.
- Ahn, K. S. (1996), A Study on the Anticancer and immunostimulating agent from the root of *Angelica gigas* Nakai, Ph.D. Dissertation, Dept. of Biology, Korea University, Seoul.
- Rye, K. S., N. D. Hong, N. J. Kim, and Y. Y. Kong (1990), Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai, *Kor. J. Pharmacogn.* **21**,
- Hellwig, S., J. Drossardk, R. M. Twyman, and R. Fisher (2004), Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nat. Biotechnol.* **22**, 1415-1422.
- Ma, J. K. C., P. W. M. Drake, and P. Christou (2003), The production of recombinant pharmaceutical protein in plants, *Nat. Rev.* **4**, 794-805.
- Schugerl, K. and J. Hubbuch (2005), Integrated bioprocesses, *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 294-300.
- Palomare, M. R. (2004), Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products, *J. Chromatogr. A* **807**, 3-11.
- Hooker, B. S. and J. M. Lee (1990), Cultivation of plant cells in aqueous two-phase polymer system, *Plant Cell Rep.* **8**, 546-549.
- Jia, S., P. Li, Y. S. Park, and M. Okabe (1996), Enhanced oxygen transfer in tower bioreactor on addition of liquid hydrocarbons, *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 191-193.
- Platis, D. and N. E. Labrou (2006), Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract, *J. Chromatogr. A* **1128**, 114-124.
- Palomares, L. A., Gonzalez M., and O. T. Ramirez (2000), Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: impact on shear protection, recombinant protein, and baculovirus production, *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 324-331.
- Anthony, P., M. R. Davey, J. B. Power, C. Washington, and K. C. Lowe (1994), Synergistic enhancement of protoplast growth by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68, *Plant Cell Rep.* **13**, 251-255.
- Murhammer, D. W. and C. F. Goochee (1988), Scaleup of insect cell culture: protective effects of Pluronic F-68, *Bio/Technology* **6**,

- 1411-1418.
14. Anthony, P., N. B. Jelodar, K. C. Lowe, J. B. Power, and M. R. Davey (1996), Pluronic F-68 increases the post-thaw growth of cryopreserved plant cells, *Cryobiology* **33**, 508-514.
 15. Bassetti, L., M. Hagendoorn, and J. Tramper (1995), Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *J. Microbiol.* **39**, 149-155.
 16. Elibol, M. (1999), Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of Pluronic F-68, *Process Biochem.* **34**, 557-561.
 17. Lai, L. S. T., T. H. Tsai, and T. C. Wang (2002), Application of oxygen vectors to *Aspergillus terreus* cultivation, *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 453-459.
 18. Jia, S., Wang M., P. Kahar, Y. S. Park, and M. Okabe (1997), Enhancement of yeast fermentation by addition of oxygen vectors in air-lift bioreactor, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 176-178.
 19. Ju, L. K. (1991), Enhancing oxygen transfer in bioreactors by perfluorocarbon emulsions, *Biotechnol. Prog.* **7**, 323-329.
 20. Drouin, C. M. and D. G. Cooper (1992), Biosurfactants and aqueous two-phase fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 86-90.
 21. Ho, C. S., L. K. Ju, and R. F. Baddour (1990), Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane, *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1110-1118.
 22. Murhammer, D. W. and C. F. Goochee (1990), Structural features of nonionic polyglycol polymer molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactor, *Biotechnol. Prog.* **6**, 142-148.
 23. Jewitt, N. J., K. C. Lowe, and D. I. de Pomerai (1999), Oxygenated perfluorocarbon promotes nematode growth and stress-sensitivity in a two-phase liquid culture system, *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 349-356.
 24. Bassetti, L. and J. Tramper (1995), Increased anthraquinone production by *Morinda citrifolia* in a two-phase system with Pluronic F-68, *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 353-358.
 25. Giridhar, R. and A. K. Srivastava (2000), Productivity enhancement in L-sorbose fermentation using oxygen vector, *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 537-541.
 26. Jia, S., P. Li, Y. S. Park, and M. Okabe (1996), Enhanced oxygen transfer in tower bioreactor on addition of liquid hydrocarbons, *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 191-193.